

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 413—419, Juli 1970

Cholesterinstoffwechsel und Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma bei experimenteller Hepatitis und Cholestase an der Ratte

VON R. KATTERMANN UND D. I. WOLFRUM

Medizinische Universitätsklinik, Sektion Klinische Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 24. März 1970)

An männlichen Wistar-Ratten wurde durch intraperitoneale Injektion von 0,50—0,75 g/kg D-Galaktosamin eine Hepatitis und durch einmalige, orale Applikation von 150 mg/kg α -Naphthylisothiocyanat eine intrahepatische Cholestase erzeugt. Nach 12, 24, 48 und 72 Stdn. wurden die Konzentrationen des gesamten und freien Cholesterins in Leber und Plasma sowie die Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma zusammen mit anderen Enzymaktivitäten gemessen:

1. Bei Galaktosamin-Hepatitis trat ein rascher Abfall der Aktivität auf 10% der Norm auf, während die Alanin- und Aspartat-Transaminase auf das 100-fache des Kontrollwertes anstiegen.
2. Parallel zum Abfall der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase sanken die Cholesterinester im Plasma auf 15% des Normwertes ab und blieben während der gesamten Beobachtungszeit erniedrigt, obwohl das freie Cholesterin nach 48—72 Stdn. deutlich anstieg. Dabei wurde auch ein Anstieg der Cholesterinester in der Leber bei gleichzeitiger Triglycerideinlagerung beobachtet.
3. Bei Cholestase nach α -Naphthylisothiocyanat zeigte sich im Plasma nur ein relatives Absinken der Esterfraktion von 67 auf 43%, wegen der ungleich stärkeren Vermehrung des freien Cholesterins. In der Leber fand sich ein gegensinniges Verhalten, d. h. die Cholesterinester nahmen stärker zu als das freie Cholesterin. Die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase-Aktivität war dabei gegenüber der Norm nicht erniedrigt, sondern eher etwas erhöht.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Bildung der Cholesterinester im Plasma von der Sekretion eines spezifischen Enzyms durch die Leber abhängt. Die Aktivität dieser Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma nimmt daher bei experimenteller Leberschädigung durch Galaktosamin rasch ab mit nachfolgender Erniedrigung der Cholesterinester.

Cholesterol metabolism and plasma lecithin-cholesterol acyl transferase in experimental hepatitis and cholestasis in the rat

A hepatitis was produced in male Wistar rats by the intraperitoneal injection of 0.50—0.75 g D-galactosamine per kg, and an intrahepatic cholestasis was produced by a single peroral application of 150 mg α -naphthyl-iso-thiocyanate per kg. After 12, 24, 48 and 72 hr, the concentrations of total and free cholesterol in the liver and plasma and the activity of the plasma lecithin-cholesterol acyl transferase were measured, together with other enzyme activities.

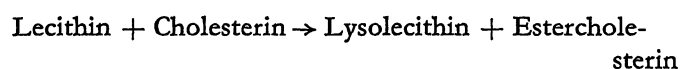
1. In galactosamine hepatitis there was a rapid fall in the activity of the lecithin-cholesterol acyl transferase activity to about 10% of normal, while the alanine and aspartate transaminase increased 100-fold over the control values.
2. Parallel to the decrease of lecithin-cholesterol acyl transferase, the plasma cholesterol esters fell to about 15% of the normal value and remained low for the duration of the observed period. The free cholesterol, however, showed a marked increase after 48—72 hr and there was also an increase in the cholesterol esters in the liver, accompanied by the deposition of triglycerides.
3. After α -naphthyl-iso-thiocyanate there was only a relative decrease of the ester fraction from 67 to 43%, due to the unequally strong increase in the free cholesterol. In the liver, the relationship was reversed, i. e. the cholesterol esters increased more than the free cholesterol. The lecithin-cholesterol acyl transferase activity was not decreased compared with the norm, but rather showed an increase.

These findings indicate that the formation of cholesterol esters in the plasma depends upon the secretion of a specific enzyme by the liver. Thus the rapid decrease of the lecithin-cholesterol acyl transferase in experimental liver damage by galactosamine results in a lowered concentration of cholesterol esters.

Über Veränderungen der Plasmalipide bei menschlichen Leberkrankheiten liegen zahlreiche Mitteilungen vor. Von THANNHAUSER und SCHABER (1) wurden 1926 erstmals die „Beziehungen des Gleichgewichtes von Cholesterin und Cholesterinestern im Plasma zur Leberfunktion“ aufgezeigt. Obwohl ZIEVE (2) solche Beziehungen ablehnte und eine direkte Abhängigkeit des Estercholesterins von der Höhe des Plasmabilirubins annahm, war bis vor kurzem doch die Meinung vorherrschend, daß das Absinken der Esterfraktion im Plasma Ausdruck mangelnder Cholesterinveresterung in der geschädigten Leber sei (3, 4, 5, 6).

Nach GLOMSET (7) scheint jedoch ein plasmaspezifisches Enzym, die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase („Transferase“), in erster Linie für die Bildung

der Cholesterinester im Plasma verantwortlich zu sein. Das Enzym katalysiert die Übertragung eines Fettsäurerestes von der C₂-Position des Lecithins nach folgender Gleichung:



Als schlüssiger Beweis für die physiologische Bedeutung der Transferase ist das von GJONE und NORUM (8) nachgewiesene Fehlen der Cholesterinester im Plasma bei drei Schwestern mit angeborenem Mangel dieses Enzyms anzusehen. Nach den Untersuchungen der genannten Autoren ist die Synthese bzw. Sekretion des Enzymproteins und der α -Lipoproteine in der Leber gestört. Es erschien uns daher interessant, bei zwei For-

men der experimentellen Leberschädigung, der Galaktosamin-Hepatitis (9, 10) und der durch α -Naphthylisothiocyanat hervorgerufenen Cholestase (11, 12), die Aktivität der Transferase im Plasma sowie die Konzentration von Cholesterin und Cholesterinestern in Plasma und Leber näher zu studieren.

Im folgenden wird über die Ergebnisse dieser Untersuchungen und über eine vereinfachte Methodik zur Aktivitätsbestimmung der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase berichtet.

Methoden

Die Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma wurde nach den Angaben von GLOMSET und WRIGHT (13) gemessen. Dabei wird das Enzym mit radioaktiv markiertem Cholesterin und Lipoprotein-gebundenem Lecithin über 2–6 Stdn. bei 37° C inkubiert. Anstelle einer Folch-Extraktion des Ansatzes mit anschließender Einengung und Isolierung der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie wählten wir eine direkte Trennung auf der Dünnschicht-Platte. Dafür wurde folgendes Vorgehen ausgearbeitet:

Herstellung der Lösungen

Lecithin („Fettsäure-Donator“) in Lipoprotein-Bindung wird entsprechend den Angaben von l. c. (13) aus 14 Tage altem Human-Plasma (Konserven) nach 20-minütigem Inaktivieren bei 56° und Abzentrifugieren des gebildeten Präzipitats erhalten. Wegen gleichmäßiger Testbedingungen Herstellung einer größeren Charge. Einstellen des pH auf 7,5 mit 0,1 N NaOH an der Glaselektrode und Bestimmung des gesamten und freien Cholesterins nach SPERRY und WEBB (14). Das freie Cholesterin sollte zur Vergleichbarkeit mit anderen Chargen auf etwa 30 mg/100 ml eingestellt werden. Abfüllen in Einzelportionen zu 1,0 ml und bei –15° einfrieren.

¹⁴C-Cholesterin („Fettsäure-Acceptor“) in Albumin-Bindung wurde nach PORTE und HAVEL (15) hergestellt. 50 μ C Cholesterin-[4-¹⁴C] (NEN, Spezif. Akt. 57 μ C/ μ Mol) in Benzol wird in einen Spitzkolben überführt und am Vakuum zur Trockne gebracht. Aufnehmen in 10,0 ml absol. Äthanol und Aufbewahren bei –15°. Von diesem Vorrat nach Bedarf je 1,5 ml mit 7,5 μ C Cholesterin in 14 ml inaktivierter (20 Min. bei 56°) 5proz. Humanalbuminlösung unter kräftigem Rühren einpipettieren. Anschließend Äthanol mittels 10-stdg. Durchperlen mit N₂ bei 25° entfernen, auffüllen mit Albumin auf 15 ml (0,5 μ C/ml). Aufbewahren in Portionen zu 1,0 ml bei –15°. Die Haltbarkeit von Lecithin-Lipoprotein und ¹⁴C-Cholesterin-Albumin beträgt etwa 3–4 Monate, d. h. in diesem Zeitraum werden mit Plasma von Normaltieren reproduzierbare Aktivitäten von 1,6–1,8 mU/ml (s. unten) gemessen.

Durchführung

Testansatz

In Mikroliter-Reaktionsgefäße werden pipettiert:

Lecithin	350 μ l
¹⁴ C-Cholesterin	100 μ l
Plasma	50 μ l

- Der Ansatz von insgesamt 500 μ l wird kurz gemischt und im Thermoblock oder Wasserbad von 37° während 6 Stdn. inkubiert. In jeder Serie wird ein Leerwert mit 50 μ l Wasser statt Plasma mitgeführt. Am Ende der Inkubation werden die Gefäße in ein Eisbad gebracht. Kontrollversuche über 24 Stdn. ergaben, daß unter diesen Bedingungen keine weitere Veresterung mehr stattfindet.

Dünnschichtchromatographie

Zur Abtrennung der gebildeten Cholesterinester von überschüssigem ¹⁴C-Cholesterin werden 30 μ l des Gesamtansatzes von 500 μ l

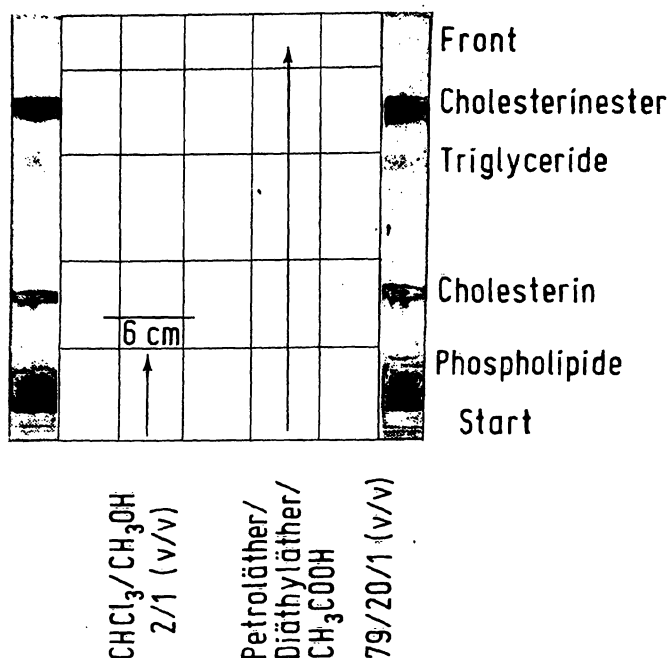


Abb. 1

Aktivitätsbestimmung der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase. Beispiel einer Abtrennung von freiem und verestertem, ¹⁴C-markiertem Cholesterin auf einer Kieselgel-G-Platte mit Fluoreszenzzusatz nach BOBERG (16). Extraktion der Lipide aus dem Plasma mit dem Solvens Chloroform: Methanol = 2:1 (v/v); nachfolgende Trennung mit Petroläther:Diäthyläther:Eisessig = 79:20:1 (v/v). Auf den beiden Randbahnen werden die aus einem Human-Testplasma getrennten Lipide mit dem KÄGI-MIESCHER-Spray sichtbar gemacht. Die dem freien und veresterten Cholesterin entsprechenden Areale in den 5 Hauptbahnen werden zur Radioaktivitätsbestimmung in TRI-CARB-Gläschen abgeschabt. — Einzelheiten s. Methodik

strichförmig auf aktivierten Kieselgel-G-Platten mit Fluoreszenzzusatz nach BOBERG (16) aufgetragen. Auf einer Platte von 20 x 20 cm befinden sich 5 Bahnen von je 3 cm Breite, sowie 2 Randbahnen zur Auftragung von 15 μ l „Donator“ als Testlipidgemisch (s. Abb. 1). Nach Lufttrocknen der Auftragstelle wird in einer ersten Kammer mit Chloroform: Methanol = 2:1 (v/v) das Lipid extrahiert (6 cm Laufstrecke). Nach Abdunsten des Solvens bringt man die Platte in eine zweite Kammer, die als Fließmittel Petroläther:Diäthyläther:Eisessig = 79:20:1 (v/v) enthält. Entwicklung bis etwa 2 cm unter den oberen Plattenrand, dann Trocknung an der Luft. Die Position der Cholesterinester läßt sich unter einer UV-Lampe i. a. sehr gut anhand einer hellen Fluoreszenz erkennen, dagegen gelingt die eindeutige Abgrenzung des freien Cholesterins nach unserer Erfahrung unter UV-Licht nicht. Daher zogen wir vor, die 5 Hauptbahnen mit einer Glasplatte abzudecken und die Testlipide in den beiden Randstreifen mit einem Spray nach KÄGI-MIESCHER¹⁾ zu lokalisieren. Die dem Cholesterin und den Cholesterinestern entsprechenden Areale in den Hauptbahnen wurden dann in TRI-CARB-Gläschen abgeschabt.

Radioaktivitätsmessung und Berechnung

Nach Zusatz von 8 ml eines Toluolszintillators (4,0 g PPO und 0,1 g POPOP mit 1000 ml Toluol lösen) wurde die Radioaktivität an einem Flüssigkeits-Szintillationszähler der Firma PACKARD gemessen. Mit einem ¹⁴C-Toluol-Standard („internal standard“) ergaben sich in mehreren Versuchsserien keinerlei Löscheffekte. Daher konnten die in 10 Min. gemessenen Impulsraten direkt in die Berechnung eingesetzt werden: Addition der in beiden Arealen gemessenen Radioaktivität und zunächst Berechnung der Enzymaktivität als prozentuale Veresterung bei 37° in 6 Stdn. Wegen der Möglichkeit von Radioaktivitätsverlusten im Aufarbeitungsgang, besonders bei der Folch-Extraktion der Originalmethode

¹⁾ Anfärbungsreagenzien für die Dünnschichtchromatographie Nr. 11 Firma MERCK A. G., Darmstadt.

(13), erschien es uns bedenklich, die absolut gemessene Radioaktivität in der Cholesterinesterfraktion als zuverlässiges Maß der Enzymaktivität anzusehen.

Da die Endkonzentration des freien Cholesterin im Ansatz von dem Cholesteringehalt des „Donators“ abhängt, muß für die Berechnung der Veresterungsrate als $\mu\text{Mol/Min.}$ der Gehalt an nicht markiertem, freiem Cholesterin zugrunde gelegt werden; in geringerem Maß geht auch der Cholesteringehalt des auf Aktivität geprüften Plasmas ein. In unserem Standardansatz entsprechen 10% Veresterung in 6 Std. bei 37° einer Enzym-Aktivität von etwa $1,7 \text{ mU/ml}$, bei einem Gehalt von 30 mg/100 ml freiem Cholesterin im „Donator“.

Bei 20-facher Auftragung eines Ansatzes auf der Dünnschicht-Platte erhielten wir bei einer mittleren Veresterungsrate von 8,25% eine Standardabweichung von 0,40, d. h. einen Variationskoeffizienten von 4,8%. Bei vergleichenden Messungen der Transferase-Aktivität mit dem Verfahren von GLOMSET und WRIGHT (13) und unserer Modifikation ergab sich die in Tabelle 1 gezeigte gute Übereinstimmung der Resultate von normalen und pathologischen Plasmen.

Tab. 1

Vergleichende Aktivitätsbestimmung der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase mit dem Extraktionsverfahren nach GLOMSET und WRIGHT (13) und unserer eigenen Modifikation auf der Dünnschicht-Platte. Die Vergleichswerte wurden jeweils aus einem einzigen Ansatz gewonnen. Angabe von je 6 Vergleichswerten normaler und pathologischer Plasmaproben. Die Mittelwerte waren nicht signifikant voneinander verschieden

Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (mU/ml)	Extraktion des Gesamtansatzes	Extraktion von $30 \mu\text{l}$ auf der Dünnschichtplatte
	1,880	2,000
	1,430	1,582
Rattenplasma (Kontrollen)	1,400	1,515
	1,840	1,850
	1,380	1,450
	1,410	1,410
$\bar{x} = 1,555$		$\bar{x} = 1,628$
	$p < 0,35$	
	0,181	0,160
	0,172	0,129
Rattenplasma (Hepatitis)	0,198	0,182
	0,162	0,164
	0,164	0,162
	0,095	0,091
$\bar{x} = 0,162$		$\bar{x} = 0,156$
	$p < 0,40$	

Für sämtliche Versuche wurden männliche Wistar-Ratten im Gewicht von 250–300 g unter Standardbedingungen benutzt. Intrahepatische Cholestase wurde wie in früheren Versuchen (12) durch orale Applikation von 150 mg/kg α -Naphthylisothiocyanat 3proz. in Olivenöl erzeugt. Eine experimentelle Hepatitis an der Ratte wurde nach den Angaben von KEPLER und Mitarbeitern (9) durch intraperitoneale Injektion von $0,5$ – $0,75 \text{ g/kg}$ D-Galaktosamin hervorgerufen. 12, 24, 48 und 72 Std. nach Erzeugung des Leberschadens wurden Gruppen von 6–20 Tieren in leichter Äthernarkose durch Herzpunktion getötet. In dem gewonnenen Plasma wurden neben der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase folgende Parameter bestimmt:

Alanin-Aminotransferase (EC 2.6.1.2) und Aspartat-Aminotransferase (EC 2.6.1.1) nach KARMEN (17)²⁾, alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) nach BESSEY und Mitarbeitern (18)²⁾, gesamtes, freies und verestertes Cholesterin nach SPERRY und WEBB (14). Eine Mikromodifikation dieser Methode mit Einsatz von $50 \mu\text{l}$ Plasma aus Kapillarblut diente für Verlaufsbeobachtungen des freien und veresterten Cholesterins am Einzeltier (19). Hinsichtlich weiterer Tests im Plasma, sowie des Lipidgehaltes und der Lipidsynthese in der geschädigten Rattenleber sei auf frühere Publikationen (10, 12, 20) verwiesen. — Die statistischen Berechnungen erfolgten mit einem Tischcomputer (Programma 101 der Firma OLIVETTI).

²⁾ Testkombination der Firma BOEHRINGER-Mannheim.

Ergebnisse

Standardisierung des Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase-Tests

Nach den Angaben von GLOMSET und WRIGHT (13) sollten bei der Messung der Transferase-Aktivität nicht mehr als 2% des eingesetzten ^{14}C -Cholesterins verestert werden. Aus diesem Grunde prüften wir zunächst für unsere Modifikation des Testes die Linearität in der Zeit, sowie die Proportionalität zur eingesetzten Menge aktiven Plasmas. In Vorversuchen zeigte sich, daß Plasma von Normaltieren bei 6-stdg. Inkubation eine Veresterungsrate von etwa 10% aufwies. Daher stellten wir für Versuche zur Zeitabhängigkeit eine Verdünnung von 1 Teil Plasma + 1 Teil Rinderalbumin her, um den von den oben zitierten Autoren angegebenen 2%-Grenzwert nicht zu sehr zu überschreiten. Derart verdünntes Ratten-Normalplasma wurde in unserem Standardansatz 2–12 Std. bei 37° inkubiert und die Veresterungsrate gemessen (Abb. 2). Es zeigte sich bis 6 Std. Inkubationsdauer eine sehr gute Linearität der Transferase-Aktivität,

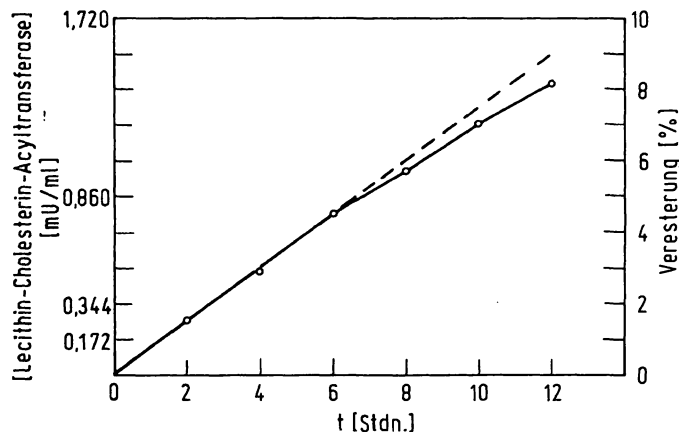


Abb. 2

Prüfung auf Linearität der Veresterungsrate durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase in der Zeit. Im Standardansatz waren enthalten: $112 \mu\text{g}$ freies Cholesterin im „Donator“ (32 mg/100 ml freies Cholesterin), $0,34 \mu\text{g}$ Cholesterin in $0,05 \mu\text{C}$ ^{14}C -Cholesterin und $7,0 \mu\text{g}$ freies Cholesterin in 1 + 1 verdünntem Ratten-Normalplasma (etwa 25 mg/100 ml freies Cholesterin). Endkonzentration des freien Cholesterin im Ansatz = $120 \mu\text{g/500 } \mu\text{l}$. Eine relative Veresterung von 10% entspricht daher unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des Cholesterins (386), der Zeit (360 Min.) und des Plasmaeinsatzes ($50 \mu\text{l}$) einer Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase-Aktivität von $1,7 \text{ mU/ml}$ Plasma. Wegen der Plasmaverdünnung wurde hier nur die Hälfte dieser Aktivität gemessen (bei 6 Std. Inkubation). Einheiten s. Methodik

die zu diesem Zeitpunkt etwa 4–5% des eingesetzten radioaktiven Cholesterins verestert hatte. Zwischen 6 und 12 Std. Inkubationsdauer knickt die Kurve dann etwas ab, was auf einer thermischen Inaktivierung des Enzyms oder auch des „Substrat-Lipoproteins“ (7) beruhen könnte. Es wird aber immerhin noch eine Veresterungsrate von etwa 8% erreicht, und auch nach 24 Std. war noch eine Zunahme der ^{14}C -Cholesterinester zu verzeichnen. Für praktische Zwecke erschien jedoch eine 6-stdg. Inkubation in Übereinstimmung mit GLOMSET und WRIGHT (13) als am besten geeignet. In einer zweiten Serie von Versuchen wurde die Menge aktiven Plasmas bei konstantem Volumen des Gesamtansatzes variiert. Im Bereich von 25 – $100 \mu\text{l}$ Plasma ergab sich eine gute Proportionalität, die jedoch bei 150 und $200 \mu\text{l}$ nicht

Tab. 2

Aktivitäten der Alanin- und Aspartat-Transaminase sowie der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma 12–72 Std. nach intraperitonealer Applikation von 0,5–0,75 g/kg D-Galaktosamin an der Ratte. — Angabe der Mittelwerte und der Streuung der Mittelwerte $\bar{S}\bar{x}$ für die verschiedenen Kollektive. Statistisch signifikante Differenzen gegenüber dem Kontrollkollektiv ($p = 0,05$ und kleiner im einfachen t-Test) sind mit einem Stern * gekennzeichnet

Enzym-Aktivitäten im Plasma mU/ml $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ n	Galaktosamin — Hepatitis				
	Kontrollen	12 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.
	20	7	20	18	6
Alanin-Aminotransferase	14,5 ± 0,8	339 ± 67*	1135 ± 227*	2276 ± 258*	1682 ± 275*
Aspartat-Aminotransferase	40,5 ± 0,9	651 ± 88*	2410 ± 273*	4107 ± 516*	2783 ± 756*
Lecithin-Cholesterin-Acyl- Transferase (37°)	1,640 ± 0,069	0,330 ± 0,055*	0,170 ± 0,021*	0,124 ± 0,01*	0,139 ± 0,043*

Tab. 3

Gesamtes, freies und verestertes Cholesterin im Plasma bei experimenteller Hepatitis an der Ratte. Angabe der Mittelwerte und der Streuung der Mittelwerte ($\bar{S}\bar{x}$). Statistische Berechnung wie in Tab. 2. Einzelheiten s. Methodik

Cholesterin im Plasma (mg/100 ml) $\bar{X} \pm S\bar{x}$ n	Kontrollen	Galaktosamin — Hepatitis			
	20	12 Stdn. 7	24 Stdn. 20	48 Stdn. 18	72 Stdn. 6
Gesamt-Cholesterin	60,6 \pm 2,1	36,0 \pm 5,2*	37,6 \pm 3,1*	73,1 \pm 5,2	71,1 \pm 4,9
Freies Cholesterin	18,0 \pm 0,9	23,4 \pm 3,7	30,6 \pm 4,1*	54,6 \pm 6,0*	52,2 \pm 5,0*
Ester-Cholesterin	42,6 \pm 1,5	12,6 \pm 4,5*	7,0 \pm 3,6*	18,5 \pm 5,6*	18,9 \pm 5,0*
Ester-Cholesterin (Relativprozent)	67,0	35,0	18,5	25,4	26,6

Tab. 4

Konzentrationen von Cholesterin und Glyceriden in der Leber bei experimenteller Hepatitis an der Ratte. Angabe der Mittelwerte und der Streuung der Mittelwerte ($\bar{S}\bar{x}$). Signifikanzprüfung und Kennzeichnung wie in Tab. 2

Lipide in der Leber (mg/g Feuchtgewicht) ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) n	Kontrollen	Galaktosamin — Hepatitis			
	23	12 Stdn. 10	24 Stdn. 23	48 Stdn. 21	72 Stdn. 10
Gesamt-Cholesterin	1,87 \pm 0,06	1,86 \pm 0,13	1,73 \pm 0,07	2,45 \pm 0,15*	2,96 \pm 0,24
Freies Cholesterin	1,63 \pm 0,05	1,47 \pm 0,09	1,40 \pm 0,06	1,76 \pm 0,11	1,96 \pm 0,14*
Ester-Cholesterin	0,24 \pm 0,06	0,39 \pm 0,11	0,33 \pm 0,07	0,69 \pm 0,13*	1,00 \pm 0,19
(Relativprozent)	17,5	21,0	19,0	28,0	33,8
Glyceride	9,5 \pm 0,59	16,9 \pm 2,7*	25,5 \pm 2,5*	20,7 \pm 2,4*	35,8 \pm 4,2*

mehr vorhanden war. Es erwies sich demnach als zweckmäßig, die von den genannten Autoren mitgeteilten Relationen von Plasma: Donator: Acceptor einzuhalten. Als obere Grenze der Veresterungsrate sehen wir für unseren Testansatz 10–12% an, wenn die Endkonzentration des freien Cholesterins im Ansatz auf 200 bis 280 $\mu\text{g/ml}$ (0,5–0,7 mm) eingestellt wird.

Galaktosamin-Hepatitis

In Tabelle 2 sind zunächst die Veränderungen der Aktivitäten von Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase und Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma bei Galaktosamin-Hepatitis dargestellt. Während die beiden Transaminasen vom Beginn der Galaktosamin-Applikation bis 48 Std. danach kontinuierlich ansteigen, sinkt die Transferase-Aktivität im gleichen Zeitraum auf etwa 7% des Kontrollwertes ab. Dabei fällt auf, daß bereits nach 12 Std. nur noch 20% der normalen Aktivität im Plasma vorhanden sind. Das Enzym verbleibt bis zum Ende unseres Beobachtungszeitraumes (72 Std.) auf einem niedrigen Niveau, obwohl die Transaminasen zu diesem Zeitpunkt rückläufige Tendenz zeigen.

Vergleicht man die geschilderten Veränderungen der Transferase-Aktivität mit den Bewegungen der verschiedenen Plasmacholesterinfractionen (s. Tab. 3), fällt in erster Linie eine Parallellität bei den Cholesterinsternen auf. Auch hier findet sich bereits 12 Std. nach Galaktosamin ein Abfall auf etwa 30% des Kontrollwertes;

nach 24 Std. wird ein Minimum mit 7,0 mg/100 ml Estercholesterin erreicht (16% der Norm). In den späteren Phasen findet ein leichter, absoluter und relativer Anstieg des Estercholesterins statt, ohne jedoch die 25%-Grenze wesentlich zu überschreiten. Deutlich stärker ist die Zunahme des freien Cholesterins im Plasma nach 48–72 Std., auf deren Ursache hier nicht näher eingegangen werden soll.

Überraschend waren die Ergebnisse der Lipiduntersuchungen in der Leber (s. Tab. 4). Hier liegen unter Normalbedingungen weniger als 20% des Cholesterins in veresterter Form vor. 12 und 24 Std. nach Galaktosamin-Applikation nimmt die Esterfraktion anscheinend weder zu noch ab. Dann aber macht sich eine deutlich ansteigende Tendenz bemerkbar, so daß nach 72 Std. das Vierfache des Normwertes erreicht wird. Das freie Cholesterin verändert sich während der gesamten Versuchsdauer nur wenig; daher steigt der prozentuale Anteil der Esterfraktion am Gesamtcholesterin in der Leber auf das Zweifache (34 gegen 17%) gegenüber dem Kontrollkollektiv an. Bemerkenswert erscheint eine parallele Bewegung der Glyceride, die innerhalb von 3 Tagen von 9,5 auf 33,8 mg/g zunahm, was histologisch als Leberverfettung imponiert (10).

Cholestase

Durch einmalige orale Applikation von α -Naphthylisothiocyanat läßt sich an der Ratte das Vollbild einer reversiblen, intrahepatischen Cholestase erzeugen (11,

**Weitere neue Geräte
aus dem
Laborprogramm:**

**Automatischer
Fraktionssammler
Fracpac LB 9300**

**Halbautomatisches
Verschungsgerät
Micro-Mat BF 5010**

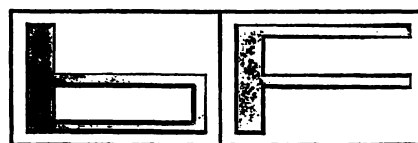
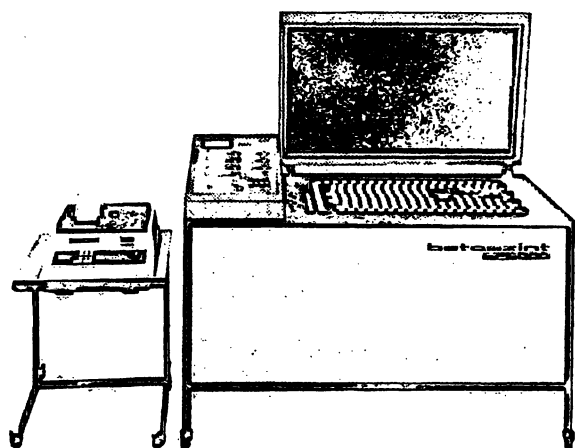
BETASZINT BF 5000

**Flüssigszintillations-
Meßplatz**

Der Betaszint BF 5000 ist eine gemeinschaftliche Neuentwicklung der Firmen Laboratorium Prof. Dr. Berthold, Wildbad und Friesseke & Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck.

Er ist nach modernsten Elektronik-Techniken unter weitgehender Verwendung integrierter Schaltkreise aufgebaut. Seine Konzeption berücksichtigt die neuesten Fortschritte in der Flüssigszintillationsmessung.

Durch einen angeschlossenen Tischrechner, für den vorgefertigte Programme zur Verfügung stehen, wird die Datenverarbeitung und -auswertung auf einfachste Weise allen vorkommenden Meßproblemen gerecht.

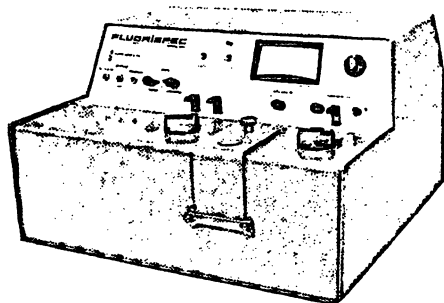


**Vertriebsgesellschaft mbH.
für Meßtechnik**

7500 Karlsruhe-Durlach

**Bergwaldstraße 30
Telefon (0721) 401011**

FLUORISPEC – Fluoreszenz-Spektrophotometer



Anwendungsgebiete:

Klinische Chemie
Biochemie
Physikalische Chemie

ausgezeichnete Auflösung bei hoher Empfindlichkeit, geringer Streulichtanteil, voll-transistorisiert, große Zubehörauswahl

Fordern Sie bitte
ausführliche Unterlagen an. Unverbindliche Vorführung und Erprobung möglich



**Biotronik
Wissenschaftliche Geräte GmbH
6000 Frankfurt/Main
Borsigallee 22 · Postfach 630265
Tel. (0611) 411216 · Telex 417230**

**Biotronik
Wissenschaftliche Geräte GmbH
Technisches Büro
8000 München
Dewetstraße 14 · Tel. (0811) 356931**



Buddecke

Grundriß der Biochemie

für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften

Von Prof. Dr. ECKHART BUDDECKE

Mit mehr als 400 Formeln, Tabellen und Diagrammen

XXXII, 499 Seiten. 1970. Plastik flexibel DM 27,50

Die progressive Zunahme des biochemischen Fachwissens erfordert eine überschaubare und zusammenfassende Darstellung der Biochemie als Hilfsmittel für den Unterricht. Der Grundriß der Biochemie von E. Buddecke gliedert den Wissensstoff in die Kapitel „Stoffe und Stoffwechsel“, „Stoffwechselregulation“ und „Funktionelle Biochemie der Organe und Gewebe“ mit dem Ziel, durch knappe Darstellung gesicherter Fakten und gezielte Stoffauswahl dem Leser einerseits eine rasche Information zu bieten, andererseits jedoch auf die vielfältigen Beziehungen und Anwendungsmöglichkeiten der Biochemie zur klinischen Chemie und Molekularpathologie hinzuweisen, um damit dem Studierenden der Medizin und Zahnmedizin sowie der anderen Gebiete der Naturwissenschaften das Verständnis klinischen Fachwissens zu erleichtern.

Inhaltsübersicht

Stoffe und Stoffwechsel

Chemische Zusammensetzung und Stoffwechsel der Zelle · Der Stoffwechsel als chemische Reaktionsfolge
Enzyme · Coenzyme · Aminosäuren · Nucleinsäuren
Proteine · Glucose und Kohlenhydrate · Lipide · Citratzyklus und biologische Oxydation · Porphyrine · Wasserhaushalt · Mineralhaushalt

Stoffwechselregulation

Selbstregulation durch Rückkopplung · Regulation durch Metabolitkonzentrationen · Enzymkonkurrenz
Hormone

Einführung · Glanduläre Hormone · Gewebshormone

Vitamine

Definition und Klassifizierung · Vitamine mit Coenzymfunktion · Vitamine ohne Coenzymfunktion · Vitaminähnliche Wirkstoffe

Funktionelle Biochemie der Organe und Gewebe

Biochemie der Zelle · Blut · Leber · Verdauung und Resorption · Niere und Urin · Muskel · Nervengewebe
Binde- und Stützgewebe · Wachstum und Abwehr



Walter de Gruyter & Co · Berlin 30

Tab. 5

Konzentrationen von Cholesterin und Glyceriden im Plasma (mg/100 ml) und in der Leber (mg/g) bei experimenteller Cholestase an der Ratte. Angabe von Mittelwerten und S \bar{x} in mg/100 ml für das Plasma und mg/g Feuchtgewicht für die Leber. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet

Lipide mg/100 ml bzw. mg/g $\bar{X} \pm S\bar{x}$ n	Kontrollen		Cholestase		Cholestase	
	Plasma 20	Leber 23	24 Stdn. Plasma 5	24 Stdn. Leber 5	48 Stdn. Plasma 5	48 Stdn. Leber 5
Gesamt-Cholesterin	60,6 \pm 2,1	1,87 \pm 0,06	121,6 \pm 9,4*	2,83 \pm 0,08*	303,8 \pm 30,2*	3,17 \pm 0,07*
Freies Cholesterin	18,0 \pm 0,9	1,63 \pm 0,05	62,0 \pm 13,9*	2,13 \pm 0,11*	175,0 \pm 30,6*	2,10 \pm 0,28*
Ester-Cholesterin	42,6 \pm 1,5	0,24 \pm 0,06	59,6 \pm 7,8	0,70 \pm 0,04*	128,8 \pm 5,45	1,07 \pm 0,24
Ester-Cholesterin (Relativprozent)	67,0	17,5	49,0	25,0	43,0	34,0
Glyceride	74,2 \pm 5,0	9,5 \pm 0,59	75,4 \pm 8,1	16,4 \pm 1,59*	133,4 \pm 32,5*	10,1 \pm 0,82

Tab. 6

Aktivitäten der Alanin- und Aspartat-Transaminase und alkalischen Phosphatase, sowie der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma 24 und 48 Stdn. nach oraler Applikation von 150 mg/kg α -Naphthylisothiocyanat an der Ratte. — Mittelwerte und Streuung der Mittelwerte (S \bar{x}) in den 3 Kollektiven

Enzym-Aktivitäten im Plasma (mU/ml) $\bar{X} \pm S\bar{x}$ n	Kontrollen		Cholestase	
	20	24 Stdn. 5	48 Stdn. 10	48 Stdn. 10
Alanin-Aminotransferase	14,5 \pm 0,8	37,4 \pm 8,7*	156,0 \pm 24,0*	156,0 \pm 24,0*
Aspartat-Aminotransferase	40,5 \pm 0,9	128,0 \pm 27,0	447,6 \pm 96,3*	447,6 \pm 96,3*
Alkalische Phosphatase	47,2 \pm 2,3	208,6 \pm 35,3*	344,0 \pm 65,4*	344,0 \pm 65,4*
Lecithin-Cholesterin-Acyl- Transferase	1,640 \pm 0,069	1,340 \pm 0,038	1,795 \pm 0,076	1,795 \pm 0,076

21). Anhand histologischer Untersuchungen und Messungen biochemischer Parameter in Plasma und Leber konnten wir uns selbst von der guten Reproduzierbarkeit dieser Form der experimentellen Cholestase überzeugen (12). Hierbei waren u. a. Veränderungen der Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber aufgefallen. Eine Zusammenfassung der hier interessierenden Befunde gibt Tabelle 5. Es zeigt sich ein Anstieg des Gesamtcholesterins im Plasma auf etwa das Fünffache der Norm, in der Leber wird nicht ganz der doppelte Wert des Kontrollkollektivs erreicht. Interessanter noch erscheint die Analyse der Subfraktionen: Zunahme des freien Cholesterins im Plasma auf etwa das Zehnfache der Norm, des Estercholesterins auf etwa das Dreifache. Das Absinken des Esterquotienten von 67 auf 43% beruht also lediglich auf einer relativen Verminderung der Cholesterinester. In der Leber sind die Verhältnisse umgekehrt, es liegt hier eine wesentlich stärkere Vermehrung des Estercholesterin (Faktor 4,5) vor, während das freie Cholesterin nur um einen Faktor 1,3 zunimmt. Auch bei der Cholestase besteht eine Tendenz zur Einlagerung von Neutralfetten in der Leber, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Galaktosamin-Hepatitis.

Setzt man diese Veränderungen bei der Cholestase in Relation zur Transferase-Aktivität im Plasma (Tab. 5), so spricht nichts für einen kausalen Zusammenhang: Das Enzym schien nach 24 Stdn. etwas abzufallen, nach 48 Stdn. lag die Aktivität sogar etwas höher als im Kontrollkollektiv, was auf der starken Zunahme des freien Cholesterins im Plasma beruhen könnte. Entsprechende Verhältnisse im Humanplasma wurden von MONGER und NESTEL (22) mitgeteilt.

Einen ähnlich starken Abfall der Transferase-Aktivität, wie er als Folge einer Galaktosamin-Hepatitis regelmäßig auftrat, konnten wir bei der Cholestase niemals beobachten. Die gleichzeitig gemessenen anderen Enzym-Aktivitäten (s. Tab. 6) zeigten jedoch eindeutig,

daß eine Reaktion der Leber auf die Applikation des α -Naphthylisothiocyanats stattfand.

Diskussion

Nach den derzeitigen Kenntnissen existieren im menschlichen und tierischen Organismus mindestens 4 Enzyme, die die Bildung bzw. Spaltung von Cholesterinestern katalysieren:

1. Die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase im Plasma — s. bei GLOMSET (7)
2. Die Fettsäure-CoenzymA-Cholesterin-Acyl-Transferase in Leber und Nebennieren — s. bei GOODMAN und Mitarbeitern (23)
3. Das Fettsäure-Transferase-System in der Leber — s. bei SWELL und LAW (4)
4. Die Cholesterinesterase aus Pankreas und Dünndarm — s. bei VAHOUNY und Mitarbeitern (24).

Es ist anzunehmen, daß die Cholesterinester im Rahmen des Lipidstoffwechsels eine wichtige Funktion ausüben. Genauere Vorstellungen darüber fehlen jedoch noch weitgehend — trotz einer großen Zahl einschlägiger Publikationen (Übersicht s. bei GOODMAN [25]). In diesem Zusammenhang ist auf neuere Arbeiten von EBERHAGEN (26) hinzuweisen, der interessanterweise in der Nebenniere nach Stimulierung der Corticoidsynthese eine Abnahme des Cholesterinestergehaltes mit Verschiebung des Fettsäuremusters in der Esterfraktion beobachten konnte. Über die Funktion der Cholesterinester im Plasma ist dagegen nichts Sicheres bekannt, sicher scheint jedoch, daß die Höhe der Esterkonzentration von der Transferase-Aktivität im Plasma und nicht von dem Cholesterin-veresternden Enzym der Leber kontrolliert wird. Hierfür konnten GLOMSET und

seine Arbeitsgruppe (7, 13, 27, 28) eine Reihe von Hinweisen liefern. Besonders interessant erscheint der Befund von GLOMSET und KAPLAN (28), daß eine nennenswerte Aktivität in keinem Organ der Ratte außer im Plasma nachweisbar war. Dennoch wurde von den genannten Autoren offen gelassen, ob es sich bei der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase um ein sog. „plasmaspezifisches“ Enzym handelt.

Als Argument für diese Annahme sind unsere Befunde bei der Galaktosamin-Hepatitis anzusehen. Während die beiden Transaminasen als Zeichen der hepatozellulären Schädigung im Plasma um einen Faktor 100–150 gegenüber der Norm ansteigen, fällt die Transferase-Aktivität im gleichen Zeitraum (24–48 Stunden) auf weniger als 10% der Norm ab. Das Enzym verhält sich bei Hepatitis also wie andere, von der Leber ins Plasma sezernierte Proteine, wie z. B. die Gerinnungsfaktoren, die Cholinesterase und das Albumin.

In Übereinstimmung mit der stark verminderten Transferase-Aktivität sinkt das Estercholesterin im Laufe der sich entwickelnden Hepatitis auf etwa 15% gegenüber dem Kontrollkollektiv ab. Dieses Verhalten ließ sich ebenso in einer großen Zahl von Verlaufsbeobachtungen am Einzeltier nachweisen (19). Interessanterweise zeigt das Estercholesterin in der Leber auf dem Höhepunkt der ikterischen Hepatitis deutlich ansteigende Werte bei gleichzeitiger Vermehrung der Triglyceride. Ein paralleler Anstieg von Cholesterinestern und Triglyceriden in der Leber wurde auch von HORNER und MORTON (29) bei Diätversuchen beobachtet. Ein erhöhter Cholesterinester-Gehalt in der Leber bei Hepatitis ist schlecht vereinbar mit der Vorstellung, daß bei Leberschädigung die mangelnde Bildung von Cholesterinestern in der Leber der Grund für deren Abfall im Plasma sei. Wir möchten vielmehr die mangelnde Sekretion von Transferase in das Plasma als primäre Ursache annehmen. Natürlich läßt sich nicht ausschließen, daß die bei Hepatitis ebenfalls veränderte Lipoprotein-Sekretion der Leber (30, 31) einen Einfluß auf die Transferase-Aktivität im Plasma ausübt. Allzu große Wahrscheinlichkeit hat diese Annahme jedoch nicht, da wir eine normale bzw. leicht erhöhte Transferase-Aktivität bei Cholestase feststellen konnten. Anscheinend gehen Cholestase und Hepatitis mit gleichartigen Lipoproteinveränderungen im Plasma einher (30, 31, 32). Im übrigen scheint bei Cholestase keine Korrelation zwischen der Höhe der Transferase-Aktivität und der veränderten Zusammensetzung der Cholesterinfraktion in Plasma und Leber zu bestehen.

Unser Befund einer erniedrigten Transferase-Aktivität mit gleichzeitigem Abfall der Cholesterinester im Plasma bei experimenteller Hepatitis korrespondiert gut mit anderen Formen der Leberschädigung. Schon FRIEDMAN und BYERS (33) fanden eine Erniedrigung der Esterfraktion bei 60–70proz. Hepatektomie an der Ratte, auch dann, wenn exogenes freies Cholesterin angeboten wurde. Von BROR und Mitarbeitern (34) wurde die Transferase an der eviszerierten Ratte gemessen. Bereits 11 Std. nach der Operation betrug die Aktivität nur noch etwa 10% des bei scheinoperierten Ratten bestimmten Wertes. Dieser Befund spricht für eine sehr kurze Halbwertszeit des Enzyms im Plasma, wie sie auch durch unsere Ergebnisse wahrscheinlich gemacht wird (s. Tab. 2). Daher wird die Neubildung der Transferase in der Leber durch Hemmstoffe der Proteinsynthese besonders stark betroffen, was von LOSSOW und Mitarbeitern (35) mittels Äthionin bewiesen wurde. Darüber hinaus konnten ZÖLLNER und Mitarbeiter (6), sowie neuerdings SUGANO und Mitarbeiter (36) zeigen, daß sich nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff bzw. Äthionin bei der Ratte die Fettsäure-Zusammensetzung der Cholesterinester bzw. die Fettsäure-Spezifität der Transferase ändert.

Die hier kurz geschilderten Untersuchungsergebnisse anderer Autoren und unsere eigenen Befunde unterstreichen die physiologische Bedeutung der Transferase bei der Bildung einer Fettsäure-spezifischen Cholesterinesterfraktion im Plasma. Die sehr sorgfältigen und aufschlußreichen Untersuchungen von NORUM und GJONE (37) an den 3 Schwestern mit familiärem Enzymdefekt haben im übrigen überzeugende Beweise für dieses Konzept geliefert. Andererseits scheint das Fehlen des Enzyms keine deletären Ausfallerscheinungen zu verursachen. Bei den 3 Schwestern fanden sich lediglich eine leichte hämolytische Anämie, eine Proteinurie und Hornhauttrübungen. Von den genannten Autoren wurde angenommen, daß bei Ausfall des Enzyms der Lipidstoffwechsel in der Zellmembran entscheidend gestört sei. Möglicherweise könnten die bei Hepatitis, Cirrhose und anderen „Leberparenchymschäden“ absinkenden Serumlipide (38, 39, 40, 41) und die dabei ebenfalls erniedrigte Transferase-Aktivität für manche der klinischen Symptome, z. B. für eine bei den genannten Krankheiten gelegentlich vorkommende, gesteigerte Hämolyse verantwortlich sein. Über Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit verschiedenen Leberkrankheiten soll zu einem späteren Zeitpunkt berichtet werden.

Literatur

1. THANNHAUSER, S. J. und H. SCHABER, *Klin. Wschr.* 5, 252 (1926).
2. ZIEVE, L., *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis* 42, 134 (1953).
3. KNÜCHEL, F., *Med. Welt* 367 (1968).
4. SWELL, L. und M. D. LAW, *Arch. Biochem. Biophysics* 113, 143 (1966).
5. ZÖLLNER, N., *Dtsch. Med. Wschr.* 89, 731 (1964).
6. ZÖLLNER, N., S. LEE und R. WITTOFF, *Klin. Wschr.* 44, 154 (1966).
7. GLOMSET, I. A., *J. Lipid Res.* 9, 155 (1968).
8. GJONE, E. und K. R. NORUM, *Acta med. Scand.* 183, 107 (1968).
9. KEPPLER, D., R. LESCH, W. REUTTER und K. DECKER, *Exper. Mol. Pathol.* 9, 279 (1968).
10. KATTERMANN, R., R. ACHÉLIS und D. I. WOLFRUM, *Acta hepato-splenologica* (im Druck).
11. STEFANELLI, N. und J. H. HOLZNER, *Z. exper. Med.* 139, 769 (1965).
12. KATTERMANN, R., R. WÖRNER, G. BRUNNER und W. HUNSTEIN, *Acta hepato-splenologica* 17, 36 (1970).
13. GLOMSET, I. A. und J. L. WRIGHT, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 89, 266 (1964).
14. SPERRY, W. M. und M. WEBB, *J. biol. Chemistry* 187, 97 (1950).
15. PORTE, D. und R. J. HAVEL, *J. Lipid Res.* 2, 357 (1961).
16. BOBERG, I., *Clin.*

- Chim. Acta (Amsterdam) 14, 325 (1966). — 17. KARMEN, A., J. Clin. Invest. 34, 131 (1955). — 18. BESSEY, O. A., O. H. LOWRY und M. J. BROCK, J. biol. Chemistry 164, 321 (1946). — 19. WOLFRUM, D. I., Inaugural-Dissertation, Göttingen (1970). — 20. KATTERMANN, R. und W. V. REIMOLD, Acta hepato-splenologica 17, 75 (1970). — 21. GOLDFARB, S., F. J. SINGER und H. POPPER, Amer. J. Path. 40, 685 (1962). — 22. MONGER, E. A. und P. J. NESTEL, Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 15, 269 (1967). — 23. GOODMAN, D. S., D. DEYKIN und T. SHIRATORI, J. biol. Chemistry 239, 1335 (1964). — 24. VAHOUNI, G. V., S. WEERSING und C. R. TREADWELL, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 98, 607 (1965). — 25. GOODMAN, D. S., Physiol. Reviews (Baltimore), 45, 747 (1965). — 26. EBERHAGEN, D., Med. Klin. 62, 1973 (1967). — 27. GLOMSET, J., F. PARKER, M. TJADEN und R. R. WILLIAMS, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 58, 398 (1962). — 28. GLOMSET, J. A. und D. M. KAPLAN, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 98, 41 (1965). — 29. HORNER, A. A. und R. A. MORTON, Biochem. J. 79, 636 (1961). — 30. PIERCE, F. T., J. R. KIMMEL und T. W. BURNS, Metabolism 3, 228 (1954). — 31. EDER, H. A., E. M. RUSS, R. A. R. RITSCHERT, M. M. WILBER und D. P. BARR, J. Clin. Invest. 34, 1147 (1955). — 32. SWITZER, S., J. Clin. Invest. 46, 1855 (1967). — 33. FRIEDMAN, M. und S. O. BYERS, J. Clin. Invest. 34, 1369 (1955). — 34. BROTH, N., W. J. LOSSOW und I. L. CHAIKOFF, J. Lipid Res. 3, 413 (1962). — 35. LOSSOW, W. J., S. N. SHAH, N. BROTH und I. L. CHAIKOFF, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 70, 593 (1963). — 36. SUGANO, M., K. HORI und M. WADA, Arch. Biochem. Biophysics 129, 588 (1969). — 37. NORUM, K. R. und E. GJONE, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 20, 231 (1967). — 38. MAN, E. B., B. L. KARTIN, S. H. DURLACHER und I. P. PETERS, J. Clin. Invest. 24, 623 (1945). — 39. ALBRINK, M. J., E. B. MAN und J. P. PETERS, J. Clin. Invest. 29, 781 (1950). — 40. PHILLIPS, G. B., J. Clin. Invest. 39, 1639 (1960). — 41. ZÖLLNER, N. und G. WOLFRUM, Klin. Wschr. 39, 817 (1961).

Priv. Doz. Dr. R. Kattermann
Sektion Klin. Chemie
Med. Universitätsklinik
34 Göttingen
Humboldtallee 1